

昆虫乙酰胆碱酯酶基因研究进展

王 敦^{1,2} , 唐振华^{2*} , 尚金燕¹ , 张传溪¹

(1. 浙江大学应用昆虫学研究所 , 杭州 310029 ; 2. 中国科学院上海植物生理生态研究所 , 上海 200032)

摘要 :对昆虫乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase , AChE , EC 3.1.1.7)的基因结构和表达等方面的研究进展进行了综述。分析了昆虫乙酰胆碱酯酶基因的结构,包括 10 个外显子的特征。对已经报道的昆虫 AChE 基因进行了系统归纳,并基于已知全序列的昆虫 AChE 基因,进行了昆虫 AChE 基因的分子进化分析。对昆虫 AChE 基因的结构特点及其功能,以及昆虫 AChE 基因的活性位点、AChE 的变构与昆虫抗药性的关系进行了探讨。最后对昆虫 AChE 基因研究中存在的问题和前景进行了分析和展望。

关键词 :乙酰胆碱酯酶 ; 乙酰胆碱酯酶基因 ; 分子进化 ; 基因突变 ; 抗药性

中图分类号 : Q966 文献标识码 : A 文章编号 : 0454-6296(2006)03-0497-07

Advances in the studies of acetylcholinesterase genes from insects

WANG Dun^{1,2} , TANG Zhen-Hua^{2*} , SHANG Jin-Yan¹ , ZHANG Chuan-Xi¹ (1. Institute of Applied Entomology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China ; 2. Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200032 , China)

Abstract :Recent advances in the studies of acetylcholinesterase (AChE , EC 3.1.1.7) genes from insects were reviewed. The gene structure , including ten exons of insect AChE gene (*ace*), was discussed. All the *ace* genes reported from insects were summed up , and the phylogenetic tree was constructed based on the reported complete sequences of *ace* genes from insects. The *ace* structure characteristics , the functional sites of *ace* genes , the effect of *ace* mutation(s) on insecticide resistance and their relationships were also discussed. Finally , the problems and prospects in the studies of insect *ace* were analyzed.

Key words :Acetylcholinesterase ; acetylcholinesterase genes ; molecular evolution ; mutation ; resistance

自 Dale(1914)提出在马血清中存在乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase , AChE , EC3.1.1.7)以来,对乙酰胆碱酯酶的研究已有 80 多年。乙酰胆碱酯酶是一种丝氨酸水解酶,它的主要功能是在胆碱能神经突触处通过快速水解神经递质乙酰胆碱(ACh)而中止神经冲动的传递。AChE 又是有机磷(OP)和氨基甲酸酯(CB)类杀虫剂的作用靶标,这两类杀虫剂是 AChE 的强力抑制剂,通过与活性位点的丝氨酸(Ser)残基形成共价键而抑制 AChE 。因此,AChE 的研究已涉及医学、军事(化学武器)化学、农药和植物保护等学科。近年来研究发现 AChE 的抑制剂可用于治疗各种疾病,如重症肌无力、青光眼和老年性痴呆症阿尔次海姆症(Alzheimer)(唐振华和毕强, 2003);还发现 AChE 与神经生长和细胞凋亡有关(Duyesen et al . , 2002)。在国际上,Fournier 等(1989)

首先对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 AChE 基因结构、进化和突变进行了研究,从而推动了昆虫 AChE 基因的研究; Taylor 和 Radi(1994)就 AChE 从基因到蛋白质作了综述,但主要集中于电鳐 *Tetronarce californica* 和其他脊椎动物。在国内,高希武(1996)及唐振华和毕强(2003)先后对 AChE 的分子生物学作了综述;林建国等(2005)就昆虫 AChE 基因突变与抗性的关系作了综述。近年来有关昆虫 AChE 基因的研究取得了重大进展,目前仅 GenBank 已收录的昆虫 *ace* 基因的 cDNA 序列已达数百条;又如关于昆虫 AChE 基因,原认为是由 1 个 *ace* 基因编码的,而现在已证实许多种至少由 2 个 *ace* 基因编码。本文就昆虫 *ace* 基因的结构及功能表达等方面的研究进展作一综述。

基金项目 :国家重点基础研究发展规划“973”计划(2003CB114403);国家自然科学基金重点项目(30230070)

作者简介 :王敦,男,1973 年生,博士,副教授,研究方向为昆虫生化与分子生物学,E-mail : wanghande@ yahoo . com . cn

* 通讯作者 Author for correspondence , E-mail : tangzh@ public6 . sta . net . cn

收稿日期 Received : 2005-09-23 ; 接受日期 Accepted : 2006-01-28

1 昆虫 AChE 基因结构及类型

1.1 昆虫 AChE 基因(*ace*)结构

自 Hall 和 Spiere(1986)首次从黑腹果蝇中克隆出 AChE 编码基因以来 , 在该领域的研究越来越成为热点。目前 GenBank 已收录的昆虫 *ace* cDNA 序列共有 289 条 , 已报道的有 21 种昆虫、3 种蜱和 1 种螨的 31 个 *ace* , 其中证实由双基因编码的有 9 种 , 其基因序列已经完整或部分测定的有 21 种 , 并有 3 种昆虫的 *ace* 已被克隆和表达(表 1)。现以黑腹果蝇的 *ace* 为代表描述昆虫 *ace* 的结构。

黑腹果蝇 AChE 有一个 1 950 bp 长的开放读框 (ORF) 转录的起始点在 -40 bp 处有一个 TATA 框 , 在该果蝇 Canton 和 MH19 品系中 ,TATA 框的序列为 TATAATA , 在其抗性品系 Oregon R 中则为 TATAACA ,TATA 框两侧是富含 GA 的区域。在 *Ubx* (Ultrabithorax 基因) 及其他基因中存在 GAGA 因子 , 它可与 GA 框结合 , 从而活化基因的转录 , 因此可以推测该 (GA)_n 区属于 AChE 基因的启动子 , 很有可能在转录起始点上游的 1.5 kb 区域内包含了 AChE 基因的所有启动子成分 , 因为紧接着就有另一个转录单位。该种果蝇 *ace* 共有 10 个外显子 , 在全长 cDNA 中外显子、内含子的拼接位点分别位于 562 、 1 409 、 1 548 、 2 094 、 2 302 、 2 445 、 2 595 、 2 759 和 2 923 之后(Fournier et al. , 1989)。第 1 个外显子有 577 个碱基 , 不含有编码序列。第 2 个外显子编码一段上游序列和信号肽 , 信号肽为 40 个氨基酸残基组成。信号肽是一段疏水性的片段 , 可以使多肽穿过细胞膜 , 之后信号肽被剪切掉 , 成为成熟的有活性的 AChE 。 AChE 是丝氨酸水解酶类 , 活性位点包括一个酯动亚位点 , 丝氨酸(S)位于其中 , 参与一个电荷依赖的系统。 S 周围的序列 S-G-E-S-A-G 是高度保守的 , 活性位点还包括一个与底物的季胺基团结合的阴离子亚位点。酯动亚位点是由外显子 IV 编码的 , 阴离子亚位点 G-S-X-F 位于 406(409 位) , 是由外显子 V 和 VI 编码的 , 外显子 III 的 109 位处是 Y , 它的改变会降低 AChE 对底物的亲和力 , 是阴离子亚位点的重要成分 , 这样外显子 III 、 IV 、 V 和 VI 都与催化有关。外显子 II 和 IV 的一部分和外显子 III 编码 16 kD 的多肽 , 外显子 IV 的一部分和 V 、 VI 、 VII 、 VIII 及 IX 共同编码 55 kD 的多肽。外显子 X 编码疏水性肽和 3' 端非编码区 , 在成熟蛋白中 , 疏水性片段由一个糖脂锚代替(Fournier et al. , 1988) , 也就是说 AChE 是以膜蛋白存在的 , 如果将缺乏 C- 末端疏水性肽的

AChE cDNA 注射入爪蟾卵母细胞核 , 则所表达的 AChE 是亲水性的 , 可以分裂为两个亚基 , 分泌入培养基中。

昆虫 *ace* 存在不同的转录本 , 如黑腹果蝇的 *ace* 存在两个不同的转录产物 , 大小分别为 4.5 和 4.8 kb 。因为该果蝇的 AChE cDNA 以至少 17 个 A 结束 , 并且发现有 2 个 poly(A) 位点(AATAAA) , 一个是在 17 个 A 序列的上游 30 个核苷酸处 , 另一个在上游 282 个核苷酸(Fournier et al. , 1988)。这样就形成了两个不同的加工位点 , 从而出现上述 4.5 和 4.8 kb 两个不同转录本。

昆虫 *ace* 转录本的大小可随虫种不同而异 , 但基因编码区长度通常在 2 kb 左右。如埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Liu et al. , 1998) 和马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu and Clark , 1995) *ace* 的最大转录长度均超过了 10 kb , 但基因编码区长度都在 2 kb 左右。

昆虫 *ace* 启动子的结构因虫种不同而异。如黑腹果蝇启动子区存在 TATA 框结构(Fournier et al. , 1989)。而埃及伊蚊 *ace* 则与大多数真核生物的 *ace* 一样 , 启动子区缺少 TATA 或 CAAT 框 , 但却含有节肢动物普遍存在的调控因子序列 TCAGT (Cherbas and Cherbas , 1993) , 对于缺乏 TATA 框的生物来讲 , 这种调控因子对启动 AChE 编码基因的表达可能有重要作用。

1.2 编码 AChE 的基因类型

尽管在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中存在 4 个 AChE 基因 , 即 *ace-1* 、 *ace-2* 、 *ace-x* 和 *ace-y* , 并分别位于线虫 X 染色体、染色体 I 和染色体 II 上 (Combes et al. , 1998) , 但在脊椎动物中编码 AChE 的基因只有 1 个 , 但通过可变剪接、表达调控和翻译后修饰可产生不同形式的 AChE(Massoulie et al. , 1999)。在昆虫中 , 原认为编码 AChE 的基因只有 1 个 , 但后来发现远比脊椎动物复杂。在黑腹果蝇 (Fournier et al. , 1989) 家蝇 *Musca domestica* (Walsh et al. , 2001 ; Kozaki et al. , 2001) 澳大利亚铜绿丽蝇 *Lucilia cuprina* (Chen et al. , 2001) 油橄榄果实蝇 *Bactrocera oleae* (Vontas et al. , 2002) 和马铃薯甲虫 (Zhu et al. , 1995 , 1996) 中的 AChE 为单基因(*ace2*) 编码。而在其他昆虫和蜱螨中的 AChE 至少由 2 个 *ace* (*ace1* 和 *ace2*) 编码(表 1)。

AChE1(由 *ace1* 编码) 和 AChE2(由 *ace2* 编码) 的主要区别在于 AChE1 中缺少一个含有 31 个氨基酸的“亲水肽片段” , 该亲水肽片段在脊椎动物和线

虫中同样缺失。而 Temeyer 等(2004)从微小牛蜱 *Boophilus microplus* 中克隆到了一段编码 620 个氨基酸的 cDNA,序列分析发现与已经存在的两个 *ace* 同源性很高,因此微小牛蜱可能存在第 3 个 *ace*,但尚缺乏生理活性方面的验证。

Weill 等(2002)认为大多数昆虫 *ace* 可能同时存在 *ace1* 和 *ace2* 两个基因,而果蝇缺少的 *ace1* 基因可能是由于在进化过程中丢失的。特别是在高等双翅目昆虫种类中,*ace1* 基因通常缺失(Russell et al., 2004)。我们最近克隆了家蚕 *Bombyx mori* 的 *ace1* 和 *ace2*(尚金燕等,待发表)结合分析对比已经报道的其他 3 种鳞翅目昆虫即小菜蛾、棉铃虫和烟青虫的 *ace* 基因,认为鳞翅目昆虫也普遍存在 *ace1* 和 *ace2* 两个基因。因此,昆虫 AChE 为多基因编码还是单基因编码与昆虫的系统进化有关,不同类群昆虫编码 AChE 的基因数还有待进一步研究。

1.3 *ace* 的转录和表达以及翻译后的修饰作用

关于昆虫的 *ace* 知之甚少,目前所知的调控多与抗性昆虫 *ace* 的转录和表达有关。Charpentier 和 Fournier(2001)研究发现,黑腹果蝇体内 AChE 量的增加,导致了抗药性的产生。Gao 和 Zhu(2002)研究了麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 的 AChE 基因后发现,对有机磷杀虫剂敏感和不敏感的个体并不存在 AChE 基因突变,但对有机磷杀虫剂不敏感的个体在 AChE 基因的转录水平高出敏感个体的 1.5 倍,说明 *ace* 的转录水平增加也可导致昆虫的抗药性。这与 Berrada 和 Fournier(1997)以及 Charpentier 和 Fournier(2001)等的研究结果相符,无论是在 *ace* 的转录水平还是表达水平上,其结果都可能在虫体内产生过量的 AChE,从而导致抗性的发生。在埃及伊蚊成虫的 mRNA 中有 3 个主要的 *ace* 转录本,其中 2 个为大的(>10 kb),1 个是小的(4 kb),而在幼虫和蛹 mRNA 中仅有 1 个最大的转录本(>10 kb),这表明在发育上可调控不同的信息。

表 1 已报道的 21 种昆虫、3 种蜱和 1 种螨的 *ace* 基因

Table 1 The acetylcholinesterase genes of 21 insect species that had been reported

种类 Species	基因类型 Classification of <i>ace</i>	与抗性相关基因 <i>ace</i> related to pesticide resistance	参考文献 References
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i> * 家蝇 <i>Musca domestica</i>	仅发现 <i>ace2</i> Only <i>ace2</i> 仅发现 <i>ace2</i> Only <i>ace2</i>	<i>ace2</i> <i>ace2</i>	Hall and Spierer, 1986; Fournier et al., 1989 黄瑶等, 1997; Kozaki et al., 2001; Walsh et al., 2001
澳大利亚铜绿丽蝇 <i>Lucilia cuprina</i>	仅发现 <i>ace2</i> Only <i>ace2</i>	<i>ace2</i>	Chen et al., 2001
油橄榄果实蝇 <i>Bactrocera oleae</i>	仅发现 <i>ace2</i> Only <i>ace2</i>	<i>ace2</i>	Vontas et al., 2002
斯氏按蚊 <i>Anopheles stephensi</i>	双基因编码 Two genes coded	未确定 Unknown	Hall and Malcolm, 1991
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i> *	双基因编码 Two genes coded	未确定 Unknown	Anthony et al., 1995; Weill et al., 2002
冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	双基因编码 Two genes coded	<i>ace1</i>	Weill et al., 2002 2003
尖音库蚊 <i>Culex pipiens</i>	双基因编码 Two genes coded	<i>ace1</i>	Bourguet et al., 1996; Malcolm et al., 1998; Weill et al., 2003
三带喙库蚊 <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	双基因编码 Two genes coded	<i>ace2</i>	Mori et al., 2001; Nabeshima et al., 2004
褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	类型未知 Unknown	未确定 Unknown	GenBank, CAH65679
黑尾叶蝉 <i>Nephrotettix cincticeps</i>	仅发现 <i>ace2</i> Only <i>ace2</i>	未确定 Unknown	Tomita et al., 2000
棉蚜 <i>Aphis gossypii</i>	双基因编码 Two genes coded	<i>ace1</i>	Li and Han, 2002; Javed et al., 2003
桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	双基因编码 Two genes coded	<i>ace2</i>	Javed et al., 2003; Nabeshima et al., 2003
麦二叉蚜 <i>Schizaphis graminum</i>	仅发现 <i>ace1</i> Only <i>ace1</i>	<i>ace1</i>	Gao et al., 2002
棉粉虱(<i>Bemisia tabaci</i>)	仅发现 <i>ace2</i> Only <i>ace2</i>	<i>ace2</i>	Javed et al., 2003
温室粉虱(<i>Trialeurodes vaporariorum</i>)	仅发现 <i>ace2</i> Only <i>ace2</i>	<i>ace2</i>	Javed et al., 2003
马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	仅发现 <i>ace2</i> Only <i>ace2</i>	<i>ace2</i>	Zhu et al., 1995, 1996
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i> *	双基因编码 Two genes coded	<i>ace2</i>	Ren et al., 2002; GenBank, AAY59530
烟青虫 <i>Helicoverpa assulta</i>	仅发现 <i>ace2</i> Only <i>ace2</i>	未确定 Unknown	GenBank, AY817736
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	双基因编码 Two genes coded	<i>ace1</i>	Ni et al., 2003; Baek et al., 2005
意大利蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	类型未知 Unknown	未确定 Unknown	GenBank, XM-392492
微小牛蜱 <i>Boophilus microplus</i>	双基因编码,可能存在三基因 Two genes coded, and a possibility of three genes coded	未确定 Unknown	Baxter and Barker, 1999, 2002; Hernandez et al., 1999; Temeyer et al., 2004
一种蜱 <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	类型未知 Unknown	未确定 Unknown	Baxter and Barker, 1999
一种蜱 <i>Boophilus decoloratus</i>	类型未知 Unknown	未确定 Unknown	Baxter and Barker, 1999
棉叶螨 <i>Tetranychus urticae</i>	仅发现 <i>ace1</i> Only <i>ace1</i>	<i>ace1</i>	Anazawa et al., 2003

* 表示已经进行了基因表达;在括号内的种类其 *ace* 基因仅部分序列已经测定。

* Indicating the *ace* had been expressed already; and for the bracketed species only partial sequence of their *ace* genes are known.

Baek 等(2005)用实时定量 PCR(quantitative real-time PCR , qrtPCR)测定了小菜蛾 OP-抗性和敏感品系的 *pxace1* 和 *pxace2* 基因在不同组织和发育阶段的转录水平 ,结果发现在两个品系中 ,成虫头、胸、腹部分的 *pxace1* 的转录水平分别比 *pxace2* 高 100~220 、 20~45 和 13~14 倍 ;*pxace1* 在幼虫头和身体中的转录水平也分别比 *pxace2* 高 100~250 倍和 47 倍。这表明不管在哪个发育阶段 *pxace1* 均为高表达。

果蝇 AChE 的翻译后修饰作用有 :(1) 通过二硫键连接 2 个活性亚基 ;(2) 蛋白糖基化 ;(3) 前体切成 2 个多肽 , 它们以非共价键结合形成活性亚基 ;(4) C 端疏水肽被剪切 , 并被 1 个糖脂取代。 Mutero 和 Fournier (1992) 应用定向位点突变和在爪蟾 *Xenopus* 卵中表达 , 研究了与果蝇 AChE 翻译后修饰相关的氨基酸作用 , 发现 Cys615 涉及二聚化 , Asp126 、 174 、 331 和 531 涉及糖基化 ; 而从 Arg148 到 Pro180 的一段亲水肽负责将 75 kD 前体的蛋白水解剪切 , 经这些突变而获得的蛋白 , 无论是单聚体还是未糖基化的 , 或未水解剪切的变异蛋白均有活性和可被分泌 , 这表明相应的翻译后修饰对该酶的活性是不重要的。

2 昆虫 *ace* 基因的分子进化

我们对 GenBank 中收录的 21 种昆虫、 3 种蜱和 1 种螨的 *ace* 的氨基酸序列 , 应用生物分析软件 DNASTAR 5.0 鼠和秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 的 *ace* 为参照 , 进行联配分析。*ace* 分子进化树(图 1)显示 , 昆虫的 *ace* 进化主要分为两大分支 , 双翅目、同翅目和鳞翅目的部分种类以及螨类和哺乳动物的 *ace* 归属于第 I 支分 , 而大多数昆虫的 *ace* 归属于第 II 支分 , 微小牛蜱的 *ace2* 和线虫则与前两个支分都较远 , 组成第 III 支分。其中 , *ace* 有双基因的昆虫 , 除棉蚜 *Myzus persicae* 和三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 外 , *ace1* 大多在第 I 支分 , 在基因进化树上与尖音库蚊 *Culex pipiens* 的 *ace1* 同属一支 ; 而 *ace2* 主要归属于第 II 支分 , 在系统发育上靠近黑腹果蝇 *ace2* 。这与 Well 等(2002)对 *ace1* 和 *ace2* 的归类结果一致。第 I 支分在系统树上自上而下分别由哺乳动物、螨类、双翅目、同翅目、鳞翅目和蜱类的 *ace* 组成亚分支 ; 第 II 支分又可分为 4 个亚分支 , 在进化树上自上而下分别为膜翅目、鞘翅目、鳞翅目、同翅目和双翅目昆虫的 *ace* , 说明 *ace* 的分子进

化与物种的进化是一致。其中 , 麦二叉蚜的 *ace* 与螨类和哺乳动物亲缘关系较近 , 这与 Gao 等(2002)研究结果一致。但从图 1 可见 , 目前昆虫 *ace1* 和 *ace2* 的命名 , 并没有反映基因的进化关系 , 建议采用 Well 等(2002)的方法 , 将与果蝇 *ace* 同在 II 组的统一命名为 *ace2* , 与尖音库蚊的 *ace1* 同在 I 组的统一命名为 *ace1* 。

3 AChE 基因突变与昆虫抗药性

目前研究表明 抗性昆虫 AChE 的变构导致变构酶对有机磷(OP)和氨基甲酸酯(CB)类杀虫剂的亲和力降低 , 从而表现出敏感度下降 ; 而 AChE 变构是由 *ace* 突变引起的。至今已报道了在 13 种昆虫中与 *ace* 突变相关的抗性。其中 12 种昆虫(包括蜱和螨类) 的 *ace* 突变的位点及其对抗性的影响详见林建国等 (2005) 的综述。另外一种是最近由 Baek 等(2005)报告的抗低毒硫磷(prothifos)的小菜蛾 *ace1* 有 3 个突变 (A201S 、 A441G 和 G227) 与抗性相关。

综合各种抗性昆虫所引起的 AChE 敏感性降低 , 其内在机制十分复杂 :(1) 编码 AChE 靶标的基因是不同的 , 从表 1 可见 , 有些昆虫只有 1 个 *ace* 基因 , 而在其他昆虫、蜱和螨中至少有 2 个 *ace* 基因 (*ace1* 和 *ace2*) 编码 AChE 。 (2) 虽然在表 1 中 , 多种昆虫的 AChE 至少是由 2 个 *ace* 基因编码 , 但只有其中 1 个 *ace* 突变基因与抗性有关。 (3) 这些不同突变既可是单个 , 也可组合构成不同的突变 , 它们的抗性谱和抗性是不同的 (Walsh et al. , 2001 ; 林建国等 2005) 。 Roussell 等 (2004) 根据生测和生化检测的资料 , 将由于 AChE 敏感度降低而引起的抗性分成两种类型 : I 型和 II 型。 I 型抗性的特征是对氨基甲酸酯类杀虫剂的抗性比 (或在生测和生化水平上 AChE 的敏感性呈现大大地降低) 大大地高于对有机磷类杀虫剂的。 II 型抗性的特点是对氨基甲酸酯和有机磷类杀虫剂的抗性比 (或 AChE 的敏感性下降) 约为相等 , 或对有机磷类杀虫剂是专一的。 Vaughan 等 (1997) 将埃及伊蚊 AChE 基因进行突变研究 , 发现位点 G285A 和 F350Y 与有机磷的抗性相关 , 而位点 F105S 、 G285A 和 F305Y 与氨基甲酸酯的抗性有关。 (4) 虽然在有些昆虫中已证明存在不敏感的 AChE , 如微小牛蜱 (Baxter and Barker , 1998 , 2002) 、黑尾叶蝉 *Nephrotettix cincticeps* (Tomita et al. , 2000) 、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Ren et al. , 2002) 、棉粉虱 *Bemisia tabaci* 和温室粉虱 *Trialeurodes*

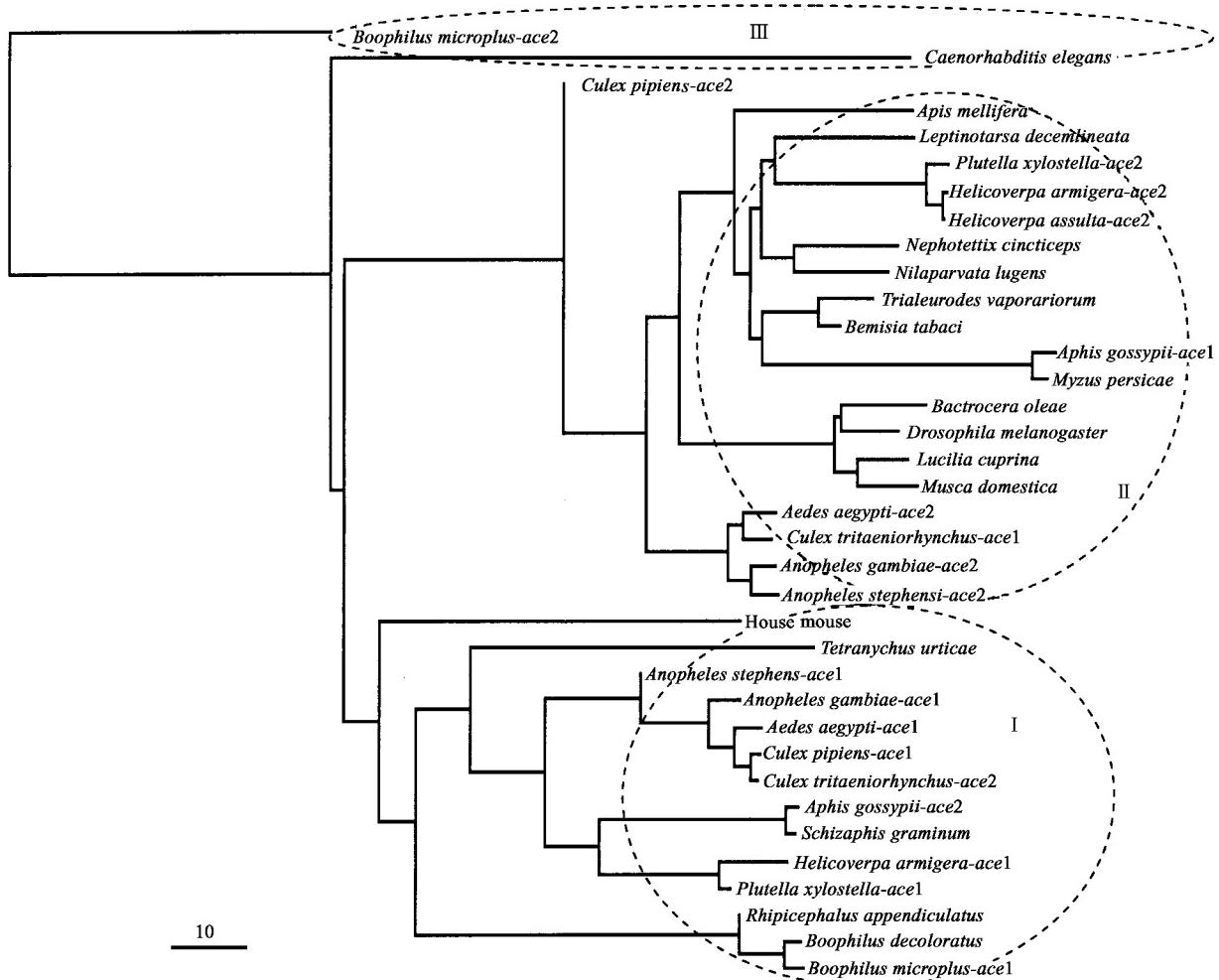


图 1 昆虫 ace 系统进化树(DNASTAR ,Version 5.0)

Fig. 1 Phylogenetic tree of insect ace drawn by the DNASTAR (Version 5.0)

基因序列来源(GenBank 登录号) Sources of ace sequences (GenBank accession no.): 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (ace1 : CAF21939 ; ace2 : AAB35001), 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (ace1 : CAD29865 ; ace2 : CAD29866), 斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* (ace1 : CAD27455 ; ace2 : 1808210A) 棉蚜 *Aphis gossypii* (ace1 : AF502081 ; ace2 : AF502082) 意大利蜜蜂 *Apis mellifera* (XM-392492) 油橄榄果实蝇 *Bactrocera oleae* (AF452052) 棉粉虱 *Bemisia tabaci* (AJ576072), *Boophilus decoloratus* (AJ006337), 微小牛蜱 *Boophilus microplus* (ace1 : AF067771 ; ace2 : AJ278345), 秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* ace-2 (AF025378), 尖音库蚊 *Culex pipiens* (ace1 : AJ489456 ; ace2 : AY196910), 三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* (ace1 : AB122151 ; ace2 : AB122152), 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (X05893), 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (ace1 : AAY59530 ; ace2 : AAM90333), House mouse (BC046327), 马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (LA1180), 澳大利亚铜绿丽蝇 *Lucilia cuprina* (U88631), 家蝇 *Musca domestica* (AF281164), 桃蚜 *Myzus persicae* (AF287291), 黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* (AF145235), 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (CAH65679), 小菜蛾 *Plutella xylostella* (ace1 : AAV65825 ; ace2 : AAL33820), *Rhipicephalus appendiculatus* (AJ006338), 麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* (AF321574), 棉叶螨 *Tetranychus urticae* (ace1 : AY188448 ; ace2 : AJ576073).

vaporariorum (Javed et al . , 2003), 但未发现相关的 ace 基因突变。 (5) 最近我们发现在黑腹果蝇 (Shi et al . , 2004) 和家蝇 (待发表) 中与抗性相关的 ace 突变蛋白 (AChE) 是不稳定的。

4 展望

果蝇基因组的研究促进了昆虫 AChE 基因的研

究, 包括昆虫 AChE 基因的克隆、表达与纯化、结构与功能的研究, 但对昆虫 ace 基因调控和分子进化研究还处于起始阶段。虽然昆虫 AChE 为多基因编码, 但其实质以及它们的生物学意义仍不清楚。上述研究推动了昆虫靶标抗性分子遗传的研究, 从基因水平阐明了靶标抗性主要与相关基因的点突变有关, 这些点突变既可以以单个突变存在, 又可以基因重组而以不同突变组合的形式存在。从果蝇

(Mutero *et al.*, 1994 ; Menozzi *et al.*, 2004) 家蝇(待发表)埃及伊蚊(Ffrench-Constant *et al.*, 1998)的研究发现 单个突变对抗性贡献较小(抗性水平较低), 而组合突变的贡献较大。最近我们与法国科学家 Fournier 合作对果蝇 ace 基因进行定向突变 , 并对这些突变的蛋白(AChE)的热力学和动力学进行了研究 , 发现 4 个突变(I161V/G265A/F330Y/G368A)中的任一突变蛋白的比活力(与野生型 AChE 相比)都呈降低 , 它们的稳定性也都呈降低 ; 况且组合突变数目越多 其比活力和稳定性降低越明显 , 它们的组合突变对抗性的贡献呈负相关(Shi *et al.*, 2004)。但在其他昆虫中尚未见类似报道 , 这种负相关性是不是一种普遍现象尚待进一步研究。

鉴于对昆虫 ace 基因的调控机制知之甚少 , 对有些抗性昆虫的 AChE 虽然已被证实对杀虫剂的敏感度下降 , 但未发现有 ace 基因突变(Tomita *et al.*, 2000)的现象 , 目前尚无法解释。另外 , 抗性果蝇 AChE 过表达可能是由转座(transposition)介导的 (Berrda and Fournier , 1997)。

昆虫 ace 不同位点的突变 , 可以引起 AChE 的变构 , 导致对不同杀虫剂产生抗性和有不同的抗性水平。但是 , 这些突变在突变中如何改变 AChE 的三维空间结构 ? 对抗性来讲 , 在突变中哪个(或哪些)突变是主要的 ? 它们又是如何互相作用的 ? 随着分子生物学、生物信息学和计算机技术的不断发展和完善 , 相信在不久的将来 , 将能破译这些奥妙。

参 考 文 献(References)

- Anazawa Y , Tomita T , Aiki Y , Kozaki T , Kono Y , 2003. Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite , *Tetranychus urticae* . *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 33 : 509 – 514.
- Anthony N , Rocheleau T , Mocelin G , Lee HJ , Ffrench-Constant R , 1995. Cloning , sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* . *FEBS Lett.* , 368 : 461 – 465.
- Arpagaus M , Combes D , Culeto E , Grauso M , Fedon Y , Romani R , Toutant JP , 1998. Four acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans* . *J. Physiol. (Paris)* , 92 : 363 – 367.
- Baek JH , Kim JI , Lee DW , Chung BK , Miyata T , Lee SH , 2005. Identification and characterization of ace1-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella* . *Pestic. Biochem. Physiol.* , 81 : 164 – 175.
- Baxter GD , Barker SC , 1999. Comparison of acetylcholinesterase genes from cattle ticks. *Intern. J. Paras.* , 29 : 1 765 – 1 774.
- Baxter GD , Barker SC , 2002. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from ticks. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 32 : 815 – 820.
- Berrada S , Fournier D , 1997. Transposition-mediated transcriptional overexpression as a mechanism of insecticide resistance. *J. Biol. Chem.* , 256 : 348 – 354.
- Bourguet D , Raymond M , Fournier D , Malcolm C , Toutant JP , Arpagaus M , 1996. Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae). *J. Neurochem.* , 67 : 2 115 – 2 123.
- Charpentier A , Fournier D , 2001. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* , 70 : 100 – 107.
- Chen Z , Newcomb R , Forbes E , McKenzie J , Batterham P , 2001. The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly , *Lucilia cuprina* . *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 31 (8) : 805 – 816.
- Cherbas L , Cherbas P , 1993. The arthropod initiator : The capsite consensus plays an important role in transcription. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 23 : 81 – 90.
- Dale HH , 1914. The action of certain esters of choline and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* , 6 : 147 – 190.
- Duyse EG , Sibley JA , Fry DL , 2002. Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet : Phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse . *Brain Res.* , 137 (1) : 43 – 54.
- Ffrench-Constant RH , Pittendrigh B , Vaughan A , 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes ? In : Denholm I , Pickett JA , Devonshire AL eds. *Insecticide Resistance : From Mechanisms to Management*. UK : CABI Publishing. 9 – 17.
- Fournier D , Karch F , Bride JM , Hall LM , Berge JB , Spierer P , 1989. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene : structure , evolution and mutations. *J. Mol. Biol.* , 210 : 15 – 22.
- Fournier D , Bride JM , Karch F , Berge JB , 1988. Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster* : Identification of two subunits encoded by the same gene. *FEBS Lett.* , 238 (2) : 333 – 337.
- Gao JR , Zhu KY , 2002. Increased expression of an acetylcholinesterase gene may confer organophosphate resistance in the greenbug , *Schizaphis graminum* (Homoptera : Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.* , 73 : 164 – 173.
- Gao JR , Kambhampati S , Zhu KY , 2002. Molecular cloning and characterization of a greenbug (*Schizaphis graminum*) cDNA encoding acetylcholinesterase possibly evolved from a duplicate gene linkage. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 32 : 765 – 775.
- Gao XW , 1996. Toxicology , biochemistry and molecular biology of acetylcholinesterase. In : Leng XF , Tang ZH , Wang YC eds. *Molecular Toxicology of Insecticides and Insect Resistance*. Beijing : China Agriculture Press. 30 – 36. [高希武 , 1996. 乙酰胆碱酯酶的毒理学、生物化学和分子生物学 . 见 冷欣夫 , 唐振华 , 王荫长主编 . 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性 . 北京 : 中国农业出版社 . 30 – 36]
- Hall LM , Malcolm CA , 1991. The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi* . *Cell Mol. Neurobiol.* , 11 (1) : 131 – 141.
- Hall LM , Spierer P , 1986. The ace locus of *Drosophila melanogaster* : structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 50 leader. *EMBO J.* , 5 : 2 949 – 2 954.
- Hernandez R , He H , Chen AC , Ivie GW , George JE , Wagner GG , 1999. Cloning and sequencing of a putative acetylcholinesterase cDNA from *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae). *J. Med. Entomol.* , 36 : 764 – 770.

- Huang Y, Qiao CL, Williamson MS, Devonshire AL, 1997. Characterization of acetylcholinesterase gene from insecticide resistant housefly (*Musca domestica*). *Chin. J. Biotech.*, 13(3):258–263. [黄瑶, 乔传令, Williamson MS, Devonshire AL, 1997. 杀虫药剂抗性家蝇品系乙酰胆碱酯酶基因的特征分析. 生物工程学报, 13(3):258–263]
- Javed N, Viner R, Williamson MS, Field LM, Devonshire AL, Moores GD, 2003. Characterization of acetylcholinesterases, and their genes, from the hemipteran species *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* (Glover), *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). *Insect Mol. Biol.*, 12:613–620.
- Kozaki T, Shono T, Tomita T, Kono Y, 2001. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31:991–997.
- Li F, Han ZJ, 2002. Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Genome*, 45:1 134–1 141.
- Lin JG, Zhang CX, Tang ZH, 2005. Advances in studies of acetylcholinesterase gene mutations associated with insecticide resistance in insect pests. *Chin. Pestic. Sci.*, 7(1):1–6. [林建国, 张传溪, 唐振华, 2005. 与昆虫抗药性相关的乙酰胆碱酯酶基因点突变研究进展. 农药学学报, 7(1):1–6]
- Liu HT, Stilwell G, Anthony N, Rocheleau T, Ffrench-Constant RH, 1998. Analysis of a mosquito acetylcholinesterase gene promoter. *Insect Mol. Biol.*, 7:11–17.
- Malcolm CA, Bourguet D, Ascolillo A, Rooker SJ, Garvey CF, Hall LM, Pasteur N, Raymond M, 1998. A sex-linked *ace* gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Mol. Biol.*, 7:107–120.
- Massoulie J, Anselment A, Bon S, Krejci E, Legay C, Morel N, Simon S, 1999. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary association and localization. *Chemico-Biological Interactions*, 119:29–42.
- Menozzi P, Shi MA, Lougarre A, Tang ZH, Fournier D, 2004. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *BMC Evol. Biol.*, 4:4.
- Mori A, Tomita T, Hidoh O, Kono Y, Severson DW, 2001. Comparative linkage map development and identification of an autosomal locus for insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect Mol. Biol.*, 10:197–203.
- Mutero A, Fournier D, 1992. Post-translational modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase. *In vitro* mutagenesis and expression in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, 267:1 695–1 700.
- Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D, 1994. Resistance associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(13):5 922–5 926.
- Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y, 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 307:15–22.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T, 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 313:794–801.
- Ni XY, Tomita T, Kasai S, Kono Y, 2003. cDNA and deduced protein sequence of acetylcholinesterase from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)(Lepidoptera : Plutellidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 38(1):49–56.
- Ren X, Han Z, Wang Y, 2002. Mechanisms of monocrotophos resistance in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 51(3):103–110.
- Russell RJ, Claudianos C, Campbell PM, Horne I, Sutherland TD, Oakeshott JG, 2004. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 79:84–93.
- Shi MA, Lougarre A, Aliès G, Fremaux I, Tang ZH, Stojan J, Fournier D, 2004. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evol. Biol.*, 4:5.
- Tang ZH, Bi Q, 2003. Molecular Behavior of Insecticide Action. Shanghai : Shanghai Far East Press. 243–324. [唐振华, 毕强, 2003. 杀虫剂作用的分子行为. 上海 : 上海远东出版社. 243–324]
- Taylor T, Radie Z, 1994. The cholinesterases : from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34:281–320.
- Temeyer KB, Davey RB, Chen AC, 2004. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) cDNA presuminatively encoding an acetylcholinesterase. *J. Med. Entomol.*, 41(3):259–268.
- Tomita T, Hidoh O, Kono Y, 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephrotettix cincticeps*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30:325–333.
- Vaughan A, Rocheleau T, Ffrench-Constant R, 1997. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exper. Parasitol.*, 87:237–244.
- Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M, Hemingway J, 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol. Biol.*, 11(4):329–336.
- Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL, Williamson MS, 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem. J.*, 359:175–181.
- Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M, 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 269:2 007–2 016.
- Weill M, Lutfalla G, Morgensen E, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M, 2003. Comparative genomics : insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423:136–137.
- Zhu KY, Clark JM, 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25:1 129–1 138.
- Zhu KY, Lee SH, Clark JM, 1996. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 55:100–108.